

# 蓝莓提取物对产超广谱 $\beta$ -内酰胺酶肺炎克雷伯菌的抑菌活性

刘单阳<sup>1</sup>, 陈昌荣<sup>1</sup>, 蓝蔚青<sup>1,2</sup>, 赵勇<sup>1,3</sup>, 孙晓红<sup>\*1,3</sup>

1 上海海洋大学食品学院, 上海 201306

2 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306

3 农业农村部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室, 上海 201306

刘单阳, 陈昌荣, 蓝蔚青, 赵勇, 孙晓红. 蓝莓提取物对产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶肺炎克雷伯菌的抑菌活性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(7): 2661-2672

Liu Danyang, Chen Changrong, Lan Weiqing, Zhao Yong, Sun Xiaohong. Inhibitory activity of blueberry extract against extended spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*[J]. Microbiology China, 2022, 49(7): 2661-2672

**摘要:**【背景】随着细菌耐药性的增强, 产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶肺炎克雷伯菌的出现严重危害食品安全和人体健康。蓝莓中含有丰富的多酚和花青素, 是天然抗菌材料的优选。【目的】分析蓝莓提取物对 3 株产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶肺炎克雷伯菌的抑制活性及作用机制, 并以牛乳为样品检测食品基质对蓝莓提取物抑菌活性的影响。【方法】利用甲醇制备巴尔德温和黑珍珠蓝莓提取物并检测提取物中总酚和花青素含量, 利用纸片扩散法检测肺炎克雷伯菌的耐药性, 利用最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC)、最小杀菌浓度 (minimum bactericidal concentration, MBC) 和生长曲线研究蓝莓提取物的抗菌活性, 通过共聚焦激光扫描显微镜观察蓝莓提取物对细胞膜完整性的影响, 并检测其在牛乳中的抑菌活性。【结果】巴尔德温和黑珍珠蓝莓提取物中的总酚含量分别为 2.3 mg/g 和 3.5 mg/g, 花青素含量分别为 67.5 mg/100 g 和 92.5 mg/100 g。两种蓝莓提取物对肺炎克雷伯菌 KP106、KP305 和 KP408 的 MIC 均为 25 mg/mL, MBC 均为 50 mg/mL。生长曲线表明, 2×MIC 的 2 种蓝莓提取物能够在 6–8 h 内将肺炎克雷伯菌杀死。共聚焦激光扫描显微镜分析表明, 蓝莓提取物能够破坏肺炎克雷伯菌细胞膜的完整性。模拟牛乳样品试验表明, 100 mg/mL 的黑珍珠蓝莓提取物能够完全抑制牛乳中肺炎克雷伯菌的生长。【结论】蓝莓提取物可通过破坏肺炎克雷伯菌的细胞膜而达到抑菌效果, 在牛乳中也具有抑制肺炎克雷伯菌的潜力。该研究为蓝莓应用于牛乳中耐药肺炎克雷伯菌的防控提供了理论参考。

**关键词:** 蓝莓; 产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶肺炎克雷伯菌; 抑菌活性; 细胞膜

基金项目: 上海市科技兴农重点攻关项目(2019-02-08-00-10-F01149)

Supported by: Shanghai Agriculture Applied Technology Development Program (2019-02-08-00-10-F01149)

\*Corresponding author: E-mail: xhsun@shou.edu.cn

Received: 2021-10-24; Accepted: 2021-12-27; Published online: 2022-01-25

## Inhibitory activity of blueberry extract against extended spectrum $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*

LIU Danyang<sup>1</sup>, CHEN Changrong<sup>1</sup>, LAN Weiqing<sup>1,2</sup>, ZHAO Yong<sup>1,3</sup>, SUN Xiaohong<sup>\*1,3</sup>

1 College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2 Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China

3 Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Products on Storage and Preservation (Shanghai), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306, China

**Abstract:** [Background] With the enhancement of drug resistance, the extended spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* (ESBL-KP) seriously threatens food safety and human health. Blueberry, rich in polyphenols and anthocyanins, is a potential natural antibacterial candidate. [Objective] To analyze the inhibitory activity and mechanism of blueberry extracts against three ESBL-KP strains and test the effect of food matrix (cow milk) on the antibacterial activity of the extracts. [Methods] Fruit extracts of *Vaccinium corymbosum* L. and *V. ashei* were prepared with methanol, and the content of total phenols and anthocyanins in the extracts was determined. The antibiotic resistance of *K. pneumoniae* was detected by disk diffusion test. The antibacterial activity of blueberry extracts was evaluated based on minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), and growth curves of strains. The effect of blueberry extracts on cell membrane integrity was detected by confocal laser scanning microscopy, and its antibacterial activity in milk was detected. [Results] The total phenol content in fruit extracts of *V. ashei* and *V. corymbosum* L. was 2.3 mg/g and 3.5 mg/g, respectively, and the anthocyanin content was 67.5 mg/100 g and 92.5 mg/100 g respectively. The MIC and MBC of two blueberry extracts against *K. pneumoniae* KP106, KP305, and KP408 were 25 mg/mL and 50 mg/mL, respectively. The growth curve showed that the two extracts at 2×MIC could kill *K. pneumoniae* within 6–8 h. Confocal laser scanning microscopy demonstrated that blueberry extracts could destroy the integrity of cell membrane. The simulated cow milk sample test showed that 100 mg/mL fruit extract of *V. corymbosum* L. could completely inhibit the growth of ESBL-KP in milk. [Conclusion] Blueberry extract exerts inhibitory effect on *K. pneumoniae* by destroying the cell membrane of the bacteria, and has the potential to prevent and control *K. pneumoniae* in milk. This study provides a theoretical reference for the application of blueberry in the prevention and control of drug-resistant *K. pneumoniae* in milk.

**Keywords:** blueberry; ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*; antibacterial activity; cell membrane

产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶肺炎克雷伯菌(extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*, ESBL-KP)是当前全球严重的公共卫生问题,其产生的超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, ESBL)由质粒介导,能水解单环类、头孢菌素类及青霉素类等药物,而

且质粒可通过接合、转化和传导等形式导致携带的耐药基因扩散,使细菌产生多重耐药,增加治疗难度与病死率<sup>[1-2]</sup>。ESBL-KP 在肉制品<sup>[1,3]</sup>、乳制品<sup>[4]</sup>及环境<sup>[5]</sup>中广泛存在。研究表明,从生鸡肉分离获得的克雷伯菌中主要的 ESBL 基因和质粒也存在于临床分离株中<sup>[6-8]</sup>,表明食品尤其

是肉制品可能是 ESBL 细菌传播给人类的途径<sup>[9]</sup>。机会性致病的 ESBL-KP 易导致食用受污染生禽产品的人患病, 由于其广泛的耐药性且缺乏有效治疗疾病的抗生素, 所以食品及食品原料中 ESBL-KP 的防控尤为重要。目前用于降低食品中致病菌风险的控制措施主要包括  $\gamma$  射线照射、气调包装、化学防腐剂和生物防腐剂等<sup>[10]</sup>, 但是这些方法存在设备和技术等方面的局限性。因此, 寻找一种安全有效的方法来控制在食品中的 ESBL-KP 至关重要。

蓝莓(*Vaccinium corymbosum*)又称蓝浆果, 富含多酚类化合物, 其提取物不仅具有抗衰老、保护视力、抗氧化、降脂等功能, 还对食源性致病菌具有良好的抑制作用<sup>[11-14]</sup>。目前, 研究发现蓝莓提取物对副溶血性弧菌<sup>[15]</sup>、肠炎沙门氏菌<sup>[16]</sup>、霍乱弧菌<sup>[17]</sup>和金黄色葡萄球菌<sup>[18]</sup>均有显著杀菌作用。蓝莓提取物能在 18 h 内将三文鱼中副溶血性弧菌的菌落总数降低 3.2 Log<sub>10</sub> (CFU/mL)<sup>[15]</sup>。此外, 蓝莓渣花色苷<sup>[19]</sup>和蓝莓叶多酚<sup>[20]</sup>能抑制鲈鱼中的菌落总数, 延长其贮藏时间。Gato 等<sup>[21]</sup>研究发现, 蓝莓多酚提取物能显著抑制耐药肺炎克雷伯菌生物被膜的形成, 降低细菌在 HT-29 细胞上的黏附性。然而蓝莓提取物对 ESBL-KP 的抑菌活性及在牛乳中的抑菌机制尚不明确。本研究拟以黑珍珠(*Vaccinium corymbosum* L.) 和巴尔德温(*Vaccinium ashei*)这 2 种蓝莓品种为原料, 探究蓝莓提取物对 3 株产 ESBL 肺炎克雷伯菌的抑制作用及相关机制, 以期为防控病原微生物、加强食品安全和提升蓝莓的应用价值提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 蓝莓

黑珍珠蓝莓(*Vaccinium corymbosum* L.)购

于上海市新浜蓝莓种植园; 巴尔德温蓝莓(*Vaccinium ashei*)购于上海市敏蓝蓝莓种植园。选取个体均一且大小一致的果实, 将其采摘后储存于-80 °C 冰箱中备用。

#### 1.1.2 菌株

肺炎克雷伯菌 KP106、KP305、KP408 分离自生牛乳中, 保存于农业农村部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估重点实验室(上海); 大肠埃希菌(*Escherichia coli*) ATCC 25922 购自美国菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)。

#### 1.1.3 培养基主要试剂和仪器

LB 肉汤培养基、LB 琼脂培养基、Mueller-Hinton 琼脂(MHA), 北京陆桥技术股份有限公司。甲醇、98%甲酸、氢氧化钠、冰醋酸、盐酸、氯化钠, 国药集团化学试剂有限公司; 福林酚溶液, 上海源叶生物有限公司。抗生素药敏纸片[氨苄西林(ampicillin)、头孢唑啉(cefazolin)、头孢他啶(ceftazidime)、头孢他啶-克拉维酸(ceftazidime-clavulanate)、头孢噻肟(cefotaxime)、头孢噻肟-克拉维酸(cefotaxime-clavulanate)、美罗培南(meropenem)、四环素(tetracycline)、多西环素(doxycycline)、庆大霉素(gentamicin)、卡那霉素(kanamycin)、阿奇霉素(azithromycin)、红霉素(erythromycin)、环丙沙星(ciprofloxacin)、氧氟沙星(ofloxacin)、氯霉素(chloramphenicol)、磺胺甲噁唑(sulfamethoxazole)、呋喃妥因(furantoin)], 北京天坛药物生物技术开发公司。

酶标仪, BioTek 公司; 共聚焦激光扫描显微镜, Carl Zeiss 公司; 旋转蒸发仪、电热恒温水浴锅, 上海申生科技有限公司; ESCO 生物安全柜, 上海生叉贸易有限公司; 恒温振荡培养箱, 上海知楚仪器有限公司; 隔水式恒温培养箱, 上海一恒科技有限公司。

## 1.2 蓝莓提取物制备

取冷冻蓝莓果实,微波加热 3 min 解冻后放入匀浆机中充分匀浆。随后取 20 g 蓝莓匀浆置于三角瓶中,加入体积比为 85:14.5:0.5 的甲醇:水:甲酸溶液后,以 200 W 功率的超声波辅助提取 5 min,涡旋 30 s 后继续超声 5 min。随后 4 500 r/min 离心 15 min 收集上清液。反复浸提,最终料液比为 1:10。将上清液进行隔膜抽滤后,旋转蒸发至恒重,用无菌去离子水定容至 10 mL,得到浓度为 2 000 mg/mL 的巴尔德温和黑珍珠蓝莓提取物,置于-20 °C 备用<sup>[16]</sup>。

## 1.3 总酚含量的测定

采用 Folin-Ciocalte 法<sup>[22]</sup>测定 2 种蓝莓提取物中的总酚含量。取 1 mL 样品定容至 10 mL 进行 10 倍倍比稀释。从中取 1 mL 加入到 5 mL 10%福林酚中,混匀后静置 4-7 min,加入 4 mL 7.5%碳酸钠溶液,在室温下孵育 1 h 后于 765 nm 处测定吸光度值。以没食子酸为标准品绘制标准曲线,并按公式(1)计算出总酚的含量。

$$\omega = \frac{C \times V \times N}{M \times 1000} \quad (1)$$

式中, $\omega$  为总酚含量(mg/g);  $C$  为没食子酸浓度(mg/mL);  $V$  为样品体积(mL);  $N$  为稀释倍数;  $M$  为样品质量(g)。

## 1.4 花青素含量的测定

蓝莓提取物中花青素浓度的检测使用 pH 值示差法<sup>[23]</sup>。取 1 mL 制备的蓝莓提取物加到 4 mL pH 1.0 的氯化钾或 4 mL pH 4.5 的醋酸钠缓冲溶液中,涡旋待其混合均匀后分别在 520 nm 和 700 nm 处检测吸光度值。根据公式(2)计算提取物中花青素浓度:

$$\text{花青素浓度(mg/L)} = A / \zeta \times 1\,000 \times M_w \times DF \quad (2)$$

式中, $A = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH 1.0}} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH 4.5}}$ ,  $A$  为最终吸光度;  $\zeta$  为矢车菊定-3-葡萄糖苷(cyanidin-

3-glucoside)的摩尔吸收系数(26 900);  $M_w$  为摩尔质量(449.2);  $DF$  为稀释倍数。

## 1.5 肺炎克雷伯菌耐药谱测定

### 1.5.1 肺炎克雷伯菌耐药谱检测

采用美国临床实验室标准化研究所(Clinical and Laboratory Standard Institute, CLSI)推荐的药敏纸片法检测肺炎克雷伯菌对氨苄西林、头孢唑林、头孢他啶、头孢噻肟、美罗培南、四环素、多西环素、庆大霉素、卡那霉素、阿奇霉素、红霉素、环丙沙星、氧氟沙星、氯霉素、磺胺甲噁唑和呋喃妥因共 16 种抗生素的敏感性。将肺炎克雷伯菌 KP106、KP305 和 KP408 接种于 5 mL LB 肉汤培养基中,37 °C、200 r/min 摇床培养过夜后,取 100  $\mu$ L 培养物重新接种于 5 mL 的 LB 肉汤中,37 °C、200 r/min 摇床中培养 4 h 至  $10^9$  CFU/mL,3 000 r/min 离心 10 min 后重悬于等体积生理盐水中,并稀释至  $10^6$  CFU/mL,用无菌棉签将菌液涂布于 MHA 平板后,将抗生素纸片贴于 MHA 平板上,37 °C 培养 16-18 h 后测量抑菌圈直径。以大肠埃希菌 ATCC 25922 作为质控菌。根据文献[24]评价肺炎克雷伯菌对抗生素的耐药性。

### 1.5.2 产 ESBL 肺炎克雷伯菌的验证

采用 CLSI 推荐的药敏纸片法进行肺炎克雷伯菌 KP106、KP305 和 KP403 的 ESBL 试验。将头孢他啶/头孢他啶-克拉维酸、头孢噻肟/头孢噻肟-克拉维酸抗生素纸片贴于接种了肺炎克雷伯菌 KP106、KP305 或 KP408 的 MHA 平板上,37 °C 培养 16-18 h 后测量抑菌圈直径。以大肠埃希菌 ATCC 25922 作为质控菌。根据文献[24],头孢他啶或头孢噻肟中任何一种药物加与不加克拉维酸的抑菌圈相比,增加 5 mm 及以上时判定为产 ESBL。

## 1.6 蓝莓提取物的 MIC 和 MBC 测定

采用微量肉汤稀释法<sup>[25]</sup>测定蓝莓提取物对

肺炎克雷伯菌 KP106、KP305 和 KP408 的 MIC 和 MBC。向 96 孔板中加入 100  $\mu$ L LB 肉汤, 取 100  $\mu$ L 蓝莓提取物在 96 孔板中连续 2 倍比稀释。取 100  $\mu$ L 对数期的肺炎克雷伯菌 KP106、KP305 或 KP408 菌液加入到 96 孔板中, 蓝莓提取物的终浓度为 200、100、50、25、12.5 和 6.25 mg/mL, 以不含蓝莓提取物的 LB 肉汤培养基作为对照。将 96 孔板置于 37  $^{\circ}$ C 培养 24 h, 培养后无肉眼可见菌落生长的最小蓝莓提取物浓度为 MIC, 取无肉眼可见菌落生长的培养物在 LB 平板上涂布, 37  $^{\circ}$ C 培养 24 h 后无菌落生长的最小蓝莓提取物浓度为 MBC<sup>[26]</sup>。

### 1.7 蓝莓提取物对 ESBL-KP 生长的影响

根据 Lu 等<sup>[27]</sup>的方法向试管中加入 2 mL 含有 2 种蓝莓提取物(0、1 $\times$ MIC 和 2 $\times$ MIC)的 LB 肉汤培养基, 取 10  $\mu$ L 对数期的菌液分别接种到上述试管中, 37  $^{\circ}$ C、200 r/min 摇床培养, 在培养 0、2、4、6、8、12 和 24 h 时, 取出培养的试管, 连续 10 倍比稀释后涂布于 LB 平板上, 37  $^{\circ}$ C 培养 24 h 后对菌落进行计数, 绘制生长曲线。

### 1.8 蓝莓提取物对 ESBL-KP 细胞膜完整性的影响

采用荧光染色法结合共聚焦激光扫描显微镜观察蓝莓提取物对细胞膜完整性的影响<sup>[28]</sup>。将对数期的肺炎克雷伯菌菌液在 LB 肉汤培养基中稀释至  $OD_{600}$  为 0.5, 然后用 25 mg/mL 和 50 mg/mL 的黑珍珠蓝莓提取物处理 6 h, 以不含蓝莓提取物的 LB 肉汤培养基作为对照。将培养物在 4  $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 5 min 后, 弃去上清并重新悬浮于 0.85%生理盐水中。根据 LIVE/DEAD 试剂盒说明书, 用 SYTO 9 和碘化丙啶(propidium iodide, PI)对细胞进行染色后, 通过共聚焦激光扫描显微镜进行观察。

## 1.9 蓝莓提取物对牛乳中 ESBL-KP 的抑菌活性

参考 Zhang 等<sup>[26]</sup>的方法向试管中加入 2 mL 巴氏灭菌牛乳, 将制备的黑珍珠蓝莓提取物进行 2 倍比稀释, 使牛乳中蓝莓提取物的终浓度为 25–200 mg/mL。取 10  $\mu$ L 培养至对数期的肺炎克雷伯菌加到含有不同浓度蓝莓提取物的试管中, 以不含蓝莓提取物的巴氏灭菌牛乳为对照, 将试管置于 25  $^{\circ}$ C 培养 24 h, 每间隔 6 h 将培养物取出, 连续 10 倍比稀释后涂布于 LB 平板上, 37  $^{\circ}$ C 培养 24 h 后对平板上的菌落进行计数。

### 1.10 数据统计与分析

所有实验重复 3 次, 采用 GraphPad Prism 9 软件对实验结果进行统计分析并作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 两种蓝莓提取物中总酚和花青素的含量

多酚和花青素对病原菌具有良好的抑制作用, 本研究检测了 2 种蓝莓提取物中的总酚和花青素的含量。如表 1 所示, 巴尔德温蓝莓提取物中总酚和花青素含量分别为 2.3 mg/g 和 67.5 mg/100 g。与巴尔德温蓝莓相比, 黑珍珠蓝莓提取物含有的总酚和花青素更高, 分别为 3.5 mg/g 和 92.5 mg/100 g。

表 1 蓝莓提取物中的总酚和花青素含量

Table 1 Total phenol and anthocyanin content in blueberry extract

种类 Type	总酚 Total phenol (mg/g)	花青素 Anthocyanin (mg/100 g)
巴尔德温 <i>V. ashei</i>	2.3	67.5
黑珍珠 <i>V. corymbosum</i> L.	3.5	92.5

## 2.2 肺炎克雷伯菌的耐药性

### 2.2.1 肺炎克雷伯菌耐药性检测结果

肺炎克雷伯菌 KP106、KP305 和 KP408 对八大类 16 种常用抗生素的耐药性结果如表 2 所示, KP305 的耐药性最强, 对 12 种抗生素(氨苄西林、头孢唑啉、头孢他啶、头孢噻肟、四环素、多西环素、卡那霉素、阿奇霉素、红霉素、环丙沙星、氯霉素和磺胺甲噁唑)均耐药。KP106 对氨苄西林、头孢唑啉、头孢噻肟、四环素、卡那霉素、红霉素、氯霉素和磺胺甲噁唑共 8 种抗生素耐药。KP408 对氨苄西林、头孢唑啉、头孢噻肟、四环素、多西环素、红霉素和磺胺甲噁唑共 7 种抗生素耐药。耐药性检测结果表明, 肺炎克雷伯菌 KP106、KP305 和 KP408 均为多重耐药菌株。

### 2.2.2 ESBL-KP 菌株的验证

ESBL-KP 的鉴定结果如表 3 所示, 头孢他啶和克拉维酸联合使用对菌株 KP106、KP305 和 KP408 的抑菌圈直径分别为 21、22 和 27 mm, 比单独使用头孢他啶分别增加了 3、6 和 8 mm。头孢噻肟和克拉维酸联合使用对菌株 KP106、KP305 和 KP408 的抑菌圈直径分别为 26、31 和 31 mm, 与单独使用头孢噻肟的抑菌圈相比分别增加了 14、18 和 17 mm。因此, 与头孢噻肟相比, 头孢噻肟-克拉维酸对 3 株肺炎克雷伯菌的抑菌圈直径增加 5 mm 以上, 因此肺炎克雷伯菌 KP106、KP305 和 KP408 均为 ESBL-KP 菌株。

表 2 肺炎克雷伯菌对抗生素的耐药性

Table 2 Antibiotic resistance of *K. pneumoniae*

抗生素 Antibiotic	菌株 Strains		
	KP106	KP305	KP408
<b>β-内酰胺类 β-lactams</b>			
氨苄西林 Ampicillin	R	R	R
头孢唑啉 Cefazolin	R	R	R
头孢他啶 Ceftazidime	I	R	I
头孢噻肟 Cefotaxime	R	R	R
美罗培南 Meropenem	S	S	I
<b>四环素类 Tetracyclines</b>			
四环素 Tetracycline	R	R	R
多西环素 Doxycycline	S	R	R
<b>氨基糖苷类 Aminoglycosides</b>			
庆大霉素 Gentamicin	I	I	S
卡那霉素 Kanamycin	R	R	S
<b>大环内脂类 Macrolides</b>			
阿奇霉素 Azithromycin	S	R	S
红霉素 Erythromycin	R	R	R
<b>喹诺酮类 Quinolones</b>			
环丙沙星 Ciprofloxacin	S	R	S
氧氟沙星 Ofloxacin	S	I	S
<b>氯霉素类 Chloramphenicols</b>			
氯霉素 Chloramphenicol	R	R	S
<b>磺胺类 Sulfonamides</b>			
磺胺甲噁唑 Sulfamethoxazole	R	R	R
<b>硝基呋喃类 Nitrofurans</b>			
呋喃妥因 Furantoin	S	I	S

注: R: 耐药; I: 中介; S: 敏感

Note: R: Resistant; I: Intermediate; S: Susceptible.

表 3 ESBL-KP 菌株的鉴定结果(抑菌圈直径, mm)

Table 3 Identification of ESBL-KP strains (inhibition zone, mm)

菌株 Strains	头孢他啶 Ceftazidime	头孢他啶-克拉维酸 Ceftazidime-clavulanate	头孢噻肟 Cefotaxime	头孢噻肟-克拉维酸 Cefotaxime-clavulanate
KP106	18	21	12	26
KP305	16	22	13	31
KP408	19	27	14	31

### 2.3 蓝莓提取物的 MIC 和 MBC

巴尔德温和黑珍珠蓝莓提取物对 3 株 ESBL-*KP* 的最小抑菌浓度和最小杀菌浓度如表 4 所示, 2 种提取物对 3 株 ESBL-*KP* 均具有显著的抑菌和杀菌作用。巴尔德温蓝莓提取物对肺炎克雷伯菌 KP106、KP305 和 KP408 的 MIC 均为 25 mg/mL, MBC 均为 50 mg/mL。黑珍珠蓝莓提取物对 3 株肺炎克雷伯菌的 MIC 和 MBC 与巴尔德温蓝莓提取物相同, MIC 均为 25 mg/mL, MBC 均为 50 mg/mL。

### 2.4 蓝莓提取物对 ESBL-*KP* 生长的影响结果

为研究蓝莓提取物对 ESBL-*KP* 生长的影响, 测定了蓝莓提取物处理 3 株产 ESBL 肺炎克雷伯菌 24 h 内的生长曲线。如图 1 所示, 培养 24 h 后, 未经蓝莓提取物处理的肺炎克雷伯菌 KP106、KP305 和 KP408 菌落总数达到 9.0–9.4  $\text{Log}_{10}$  (CFU/mL), 比初始接种量增加了 2.7–3.6  $\text{Log}_{10}$  (CFU/mL)。经过 25 mg/mL 的巴尔德温蓝莓或黑珍珠蓝莓提取物处理 24 h 后, 3 株肺炎克雷伯菌的菌落总数与对照组相比下降了 2.9–3.6  $\text{Log}_{10}$  (CFU/mL), 与初始接种量相比下降了 0.1–1.1  $\text{Log}_{10}$  (CFU/mL), 表明肺炎克雷伯菌的生长受到明显抑制。当 2 种提取物的浓度增加到 50 mg/mL 时, 能在 6–8 h 内将菌株 KP106、KP305 和 KP408 全部杀死。巴尔德温蓝莓与黑珍珠蓝莓提取物对产 ESBL 肺炎克雷

表 4 蓝莓提取物对 ESBL-*KP* 的 MIC 和 MBC  
Table 4 MIC and MBC of blueberry extract against ESBL-*KP*

菌株 Strains	巴尔德温 <i>V. ashei</i>		黑珍珠 <i>V. corymbosum</i> L.	
	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
KP106	25	50	25	50
KP305	25	50	25	50
KP408	25	50	25	50

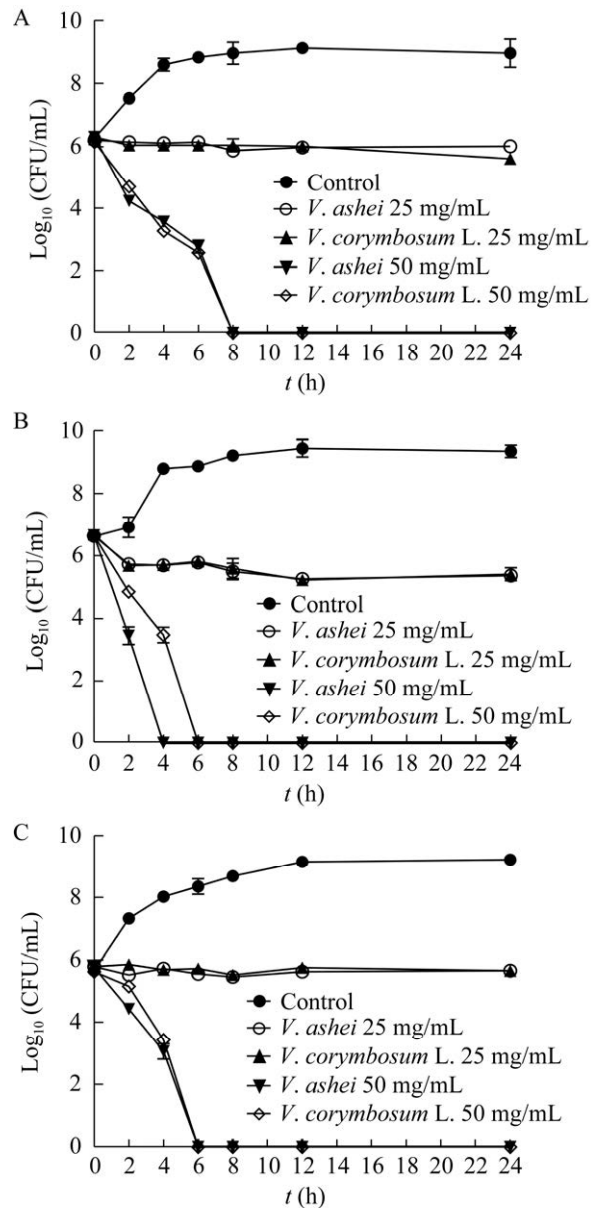


图 1 三株 ESBL-*KP* 的生长曲线

Figure 1 Growth curves of three strains of ESBL-*KP*.  
A: KP106; B: KP305; C: KP408.

伯菌株的最小抑菌浓度、最小杀菌浓度和抑菌活性无显著性差异, 因此选择黑珍珠蓝莓提取物进行后续试验。

### 2.5 蓝莓提取物对 ESBL-*KP* 细胞膜完整性的影响结果

荧光染料 SYTO9 能通过结构完整的细胞



膜进入活细胞产生绿色荧光, PI 能进入细胞膜结构受损的细胞产生红色荧光, 采用荧光染色结合共聚焦激光扫描显微镜(confocal laser scanning microscopy, CLSM)观察蓝莓提取物对细胞膜完整性的影响。如图 2 所示, 未经蓝莓提取物处理过的菌株 KP106、KP305 和 KP408 细胞呈明亮的绿色荧光, 表明细胞膜结构完整。经过 25 mg/mL 蓝莓提取物处理过后, 绿色荧光

减少、红色荧光增多; 当用 50 mg/mL 的蓝莓提取物处理 6 h 后, 菌株 KP106、KP305 和 KP408 的红色荧光显著增加、绿色荧光大量减少甚至完全消失, 表明蓝莓提取物能破坏产 ESBL 肺炎克雷伯菌细胞膜的完整性。

## 2.6 蓝莓提取物在牛乳中的抑菌活性

为了研究牛乳基质对蓝莓提取物抑菌活性的影响, 检测了不同浓度的黑珍珠蓝莓提取物

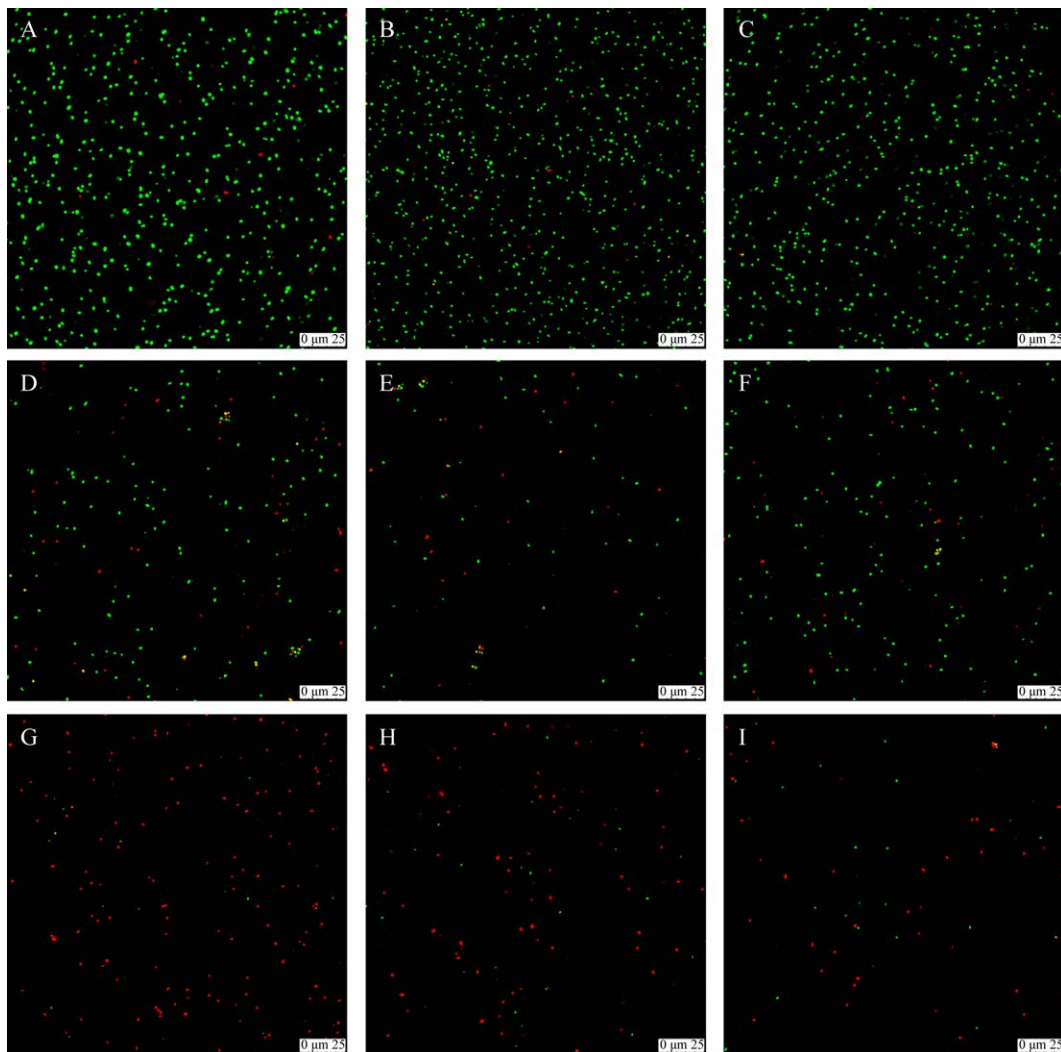


图 2 黑珍珠蓝莓提取物对 ESBL-KP 细胞膜完整性的影响 A-C: 空白对照组; D-F: 25 mg/mL 处理组; G-I: 50 mg/mL 处理组; A、D、G: KP106; B、E、H: KP305; C、F、I: KP408

Figure 2 The effects of *V. corymbosum* L. fruit extract on the membrane integrity of ESBL-KP. A-C: Control; D-F: 25 mg/mL treatment group; G-I: 50 mg/mL treatment group; A, D, G: KP106; B, E, H: KP305; C, F, I: KP408.



对牛乳中产 ESBL 肺炎克雷伯菌的抑菌活性。如图 3 所示, 与未添加蓝莓提取物的对照组相比, 25 mg/mL 和 50 mg/mL 蓝莓提取物明显抑制了菌株 KP106、KP305 和 KP408 的生长, 生长速率降低; 当用 100 mg/mL 的蓝莓提取物处

理时, 牛乳中 3 株肺炎克雷伯菌的生长完全被抑制, 培养 24 h 后活菌数比初始接种量分别降低了 0.24、0.71 和 0.14  $\text{Log}_{10}$  (CFU/mL); 当用 200 mg/mL 的蓝莓提取物处理 6 h 后, 未检测到菌株 KP106、KP305 和 KP408 的活菌数, 表明黑珍珠蓝莓提取物能有效抑制或杀灭牛乳中的产 ESBL 肺炎克雷伯菌。

### 3 讨论与结论

蓝莓中含有丰富的总酚和花青素, 其含量分别为 206.2–460.4 mg/100 g 和 20.2–128.0 mg/100 g<sup>[29]</sup>, 本研究通过甲醇萃取制备了巴尔德温蓝莓和黑珍珠蓝莓 2 种蓝莓提取物, 总酚和花青素含量与报道一致, 总酚含量分别为 2.3 mg/g 和 3.5 mg/g, 花青素含量分别为 67.5 mg/100 g 和 92.5 mg/100 g。田恒等<sup>[30]</sup>采用纤维素酶和果胶酶辅助丙酮提取金寨蓝莓花青素, 最佳提取率分别为 118.93 mg/100 g 和 56.64 mg/100 g。可见, 蓝莓品种、提取方式、产地等差异都会导致其总酚和花青素含量的不同。

蓝莓提取物对 ESBL-KP 有显著的抑制和杀灭作用, 其 MIC 值为 25 mg/mL, MBC 值为 50 mg/mL。杨天龙等<sup>[31]</sup>研究发现青刺尖的石油醚和乙酸乙酯提取物分别在 156.3–2 500.0 mg/mL、312.5–2 500.0 mg/mL 时对肺炎克雷伯菌呈现剂量依赖性的抑制作用。程招敏等<sup>[32]</sup>发现黄芩、黄连和鸡血藤对泛耐药肺炎克雷伯菌也具有抑制作用, 但其 MIC (64、128、256 mg/mL) 均高于本研究结果。中国野生蓝莓提取物对革兰氏阳性菌(如单增李斯特菌和金黄色葡萄球菌)、革兰氏阴性菌(如沙门氏菌和副溶血性弧菌)均具有良好的抑菌活性, MIC 为 12.5–100.0 mg/mL<sup>[18]</sup>, 而且革兰氏阴性菌对蓝莓提取物更敏感, 可能由于革兰氏阳性菌具有较厚的肽聚糖细胞壁, 可以保护细胞免受恶劣环境的侵害<sup>[17]</sup>。Cerezo 等<sup>[33]</sup>

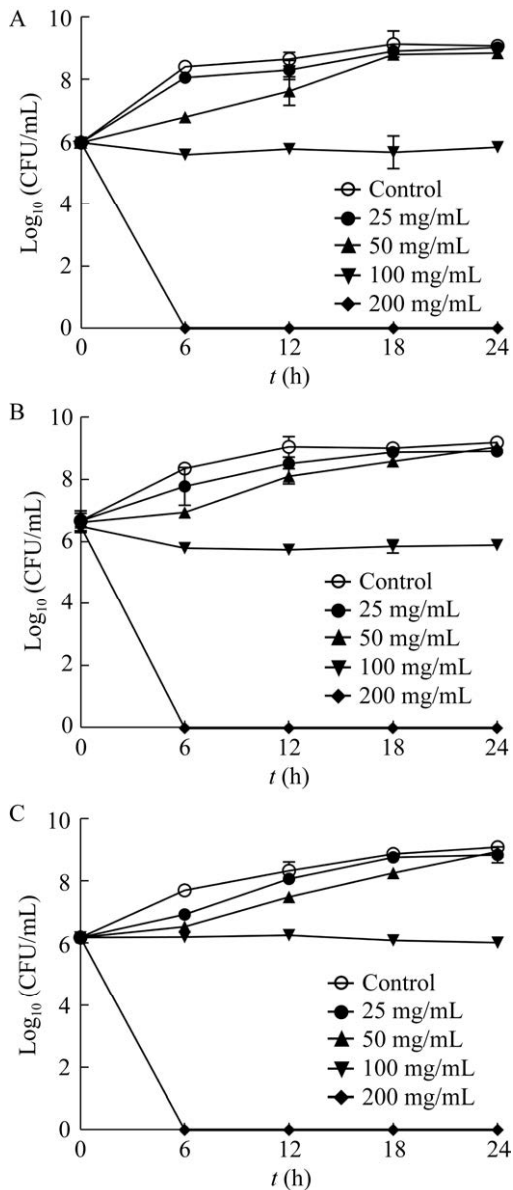


图 3 不同浓度黑珍珠蓝莓提取物对牛乳中 ESBL-KP 生长的影响

Figure 3 Effects of different concentrations of *V. corymbosum* L. fruit extract on the growth of ESBL-KP in milk. A: KP106; B: KP305; C: KP408.

发现 4 种蓝莓(Snowchaser、Star、Stella Blue 和 Cristina Blue)的花青素提取物对导致尿路感染的肺炎克雷伯菌的 MIC 和 MBC 均为 9.52 mg/mL, 低于本研究结果, 花青素提取物对肺炎克雷伯菌具有更高的抑菌活性, 表明蓝莓中主要的抑菌活性物质可能是花青素<sup>[18]</sup>, 因此, 后续可进一步研究蓝莓花青素对 ESBL-KP 的抑制作用及抑菌机制。

目前天然产物的作用方式主要有: 改变细胞膜的通透性, 引起细胞内离子失衡; 破坏细胞膜结构, 使核酸、蛋白质等生物大分子泄漏; 进入细菌细胞内部干扰蛋白合成等<sup>[34-36]</sup>。本研究中共聚焦激光扫描显微镜的结果表明, 蓝莓提取物的作用机制可能是破坏肺炎克雷伯菌的细胞膜结构, 造成细胞膜破损, 导致细胞发生致命性的损伤。有研究表明蓝莓提取物能破坏副溶血性弧菌细胞膜完整性, 使细胞内的核酸和蛋白质等大分子泄漏<sup>[18]</sup>。细胞膜在细胞质和细胞外介质之间充当屏障的作用, 使细胞选择性地控制其内部环境, 维持正常的生理活性。

食品中成分复杂, 容易对防腐剂或抑菌剂产生影响, 如蛋白质<sup>[37]</sup>、脂肪<sup>[38]</sup>和碳水化合物<sup>[39]</sup>等食品基质可能与抑菌成分发生作用, 降低其抑菌活性。有研究表明, 乳酸链球菌肽可能与牛乳中的磷脂相互作用, 使其无法有效接触细菌而导致抑菌能力降低<sup>[40]</sup>。Zheng 等<sup>[10]</sup>研究发现 200×MIC 的辅酶 Q0 才能完全杀死虾肉中的副溶血性弧菌。本研究中, 25–50 mg/mL 的黑珍珠蓝莓提取物能抑制或杀灭培养液中的肺炎克雷伯菌 KP106、KP305 和 KP408; 在牛乳模型试验中, 100 mg/mL 的黑珍珠蓝莓提取物能完全抑制肺炎克雷伯菌 KP106、KP305 和 KP408 的生长并持续至少 24 h, 200 mg/mL 的黑珍珠蓝莓提取物能在 6 h 内将肺炎克雷伯菌完全杀死。因此, 蓝莓提取物受牛乳基质影响

较小, 能有效抑制牛乳中肺炎克雷伯菌的生长。

综上所述, 蓝莓提取物中含有丰富的多酚和花青素, 能通过破坏细胞膜的完整性对产 ESBL 肺炎克雷伯菌发挥抗菌作用, 而且受牛乳中基质影响较小, 具有较高的应用潜力, 但蓝莓提取物在牛乳中的应用或作为食品安全和健康的营养补充剂有待进一步研究。

## REFERENCES

- [1] Wu H, Wang MY, Liu YQ, Wang XH, Wang YK, Lu JX, Xu H. Characterization of antimicrobial resistance in *Klebsiella* species isolated from chicken broilers[J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 232: 95-102
- [2] Guo YM, Zhou HJ, Qin LY, Pang ZZ, Qin T, Ren HY, Pan Z, Zhou JK. Frequency, antimicrobial resistance and genetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* in food samples[J]. PLoS One, 2016, 11(4): e0153561
- [3] Bobbadi S, Chinnam BK, Nelapati S, Tumati SR, Kandhan S, Gottapu C, Boddu SV. Occurrence and genetic diversity of ESBL producing *Klebsiella* species isolated from livestock and livestock products[J]. Journal of Food Safety, 2020, 40(1): e12738
- [4] Gundogan N, Yakar UA. Siderophore production, serum resistance, hemolytic activity and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella* species isolated from milk and milk products[J]. Journal of Food Safety, 2007, 27(3): 251-264
- [5] Diriba K, Awulachew E 2nd, Tekele L, Ashuro Z. Fecal carriage rate of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* among apparently health food handlers in Dilla University student cafeteria[J]. Infection and Drug Resistance, 2020, 13: 3791-3800
- [6] Egervärn M, Börjesson S, Byfors S, Finn M, Kaipe C, Englund S, Lindblad M. *Escherichia coli* with extended-spectrum beta-lactamases or transferable AmpC beta-lactamases and *Salmonella* on meat imported into Sweden[J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 171: 8-14
- [7] Leverstein-Van Hall MA, Dierikx CM, Stuart JC, Voets GM, Van Den Munckhof MP, Van Essen-Zandbergen A, Platteel T, Fluit AC, Van De Sande-Bruinsma N, Scharinga J, et al. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and

- strains[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2011, 17(6): 873-880
- [8] Overdeest I, Willemsen I, Rijnsburger M, Eustace A, Xu L, Hawkey P, Heck M, Savelkoul P, Vandenbroucke-Grauls C, Van Der Zwaluw K, et al. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, The Netherlands[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2011, 17(7): 1216-1222
- [9] Smet A, Martel A, Persoons D, Dewulf J, Heyndrickx M, Herman L, Haesebrouck F, Butaye P. Broad-spectrum  $\beta$ -lactamases among *Enterobacteriaceae* of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2010, 34(3): 295-316
- [10] Zheng XY, Guo JL, Rao HS, Guo D, Huang YX, Xu YF, Liang S, Xia XD, Shi C. Antibacterial and antibiofilm activity of coenzyme Q0 against *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Food Control*, 2020, 109: 106955
- [11] Lang YX, Li B, Gong ES, Shu C, Si X, Gao NX, Zhang WJ, Cui HJ, Meng XJ. Effects of  $\alpha$ -casein and  $\beta$ -casein on the stability, antioxidant activity and bioaccessibility of blueberry anthocyanins with an *in vitro* simulated digestion[J]. *Food Chemistry*, 2021, 334: 127526
- [12] 王怀玲. 蓝莓多酚化合物抗衰老活性及作用机制研究[D]. 广州: 华南理工大学博士学位论文, 2018
- Wang HL. Research on antiaging activity and mechanism of blueberry polyphenols[D]. Guangzhou: Doctoral Dissertation of South China University of Technology, 2018 (in Chinese)
- [13] 张元霞, 杨晶. 蓝莓的主要作用及开发[J]. *河南农业*, 2016(14): 115
- Zhang YX, Yang J. Main functions and development of blueberry[J]. *Agriculture of Henan*, 2016(14): 115 (in Chinese)
- [14] 华雨薇, 李春阳, 王帆, 刘晓林. 蓝莓叶多酚对高脂小鼠血脂及肝脏组织的影响[J]. *食品科学*, 2016, 37(11): 222-225
- Hua YW, Li CY, Wang F, Liu XL. Effect of blueberry leaf polyphenols on blood lipids and liver parameters in hyperlipidemic mice[J]. *Food Science*, 2016, 37(11): 222-225 (in Chinese)
- [15] Sun XH, Hao LR, Xie QC, Lan WQ, Zhao Y, Pan YJ, Wu VCH. Antimicrobial effects and membrane damage mechanism of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) extract against *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Food Control*, 2020, 111: 107020
- [16] Shen X, Sun XH, Xie QC, Liu HQ, Zhao Y, Pan YJ, Hwang CA, Wu VCH. Antimicrobial effect of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) extracts against the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis[J]. *Food Control*, 2014, 35(1): 159-165
- [17] Khalifa HO, Kamimoto M, Shimamoto T, Shimamoto T. Antimicrobial effects of blueberry, raspberry, and strawberry aqueous extracts and their effects on virulence gene expression in *Vibrio cholerae*[J]. *Phytotherapy Research*, 2015, 29(11): 1791-1797
- [18] Zhou TT, Wei CH, Lan WQ, Zhao Y, Pan YJ, Sun XH, Wu VCH. The effect of Chinese wild blueberry fractions on the growth and membrane integrity of various foodborne pathogens[J]. *Journal of Food Science*, 2020, 85(5): 1513-1522
- [19] 刘晨. 蓝莓渣花色苷对鲈鱼保鲜作用的研究[D]. 天津: 天津科技大学硕士学位论文, 2015
- Liu C. Research on preservative effect of anthocyanins from blueberry wine pomace on perch[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University of Science & Technology, 2015 (in Chinese)
- [20] 林智铭, 王媛媛, 赵珺泽, 曹鸿羽, 付里程, 李颖畅. 蓝莓叶多酚和溶菌酶对鲈鱼鱼片的保鲜作用[J]. *农产品加工*, 2018(21): 36-39, 44
- Lin ZM, Wang YY, Zhao JZ, Cao HY, Fu LC, Li YC. Effect of blueberry leaf polyphenols and lysozyme on storage quality of perch fillets[J]. *Farm Products Processing*, 2018(21): 36-39, 44 (in Chinese)
- [21] Gato E, Rosalowska A, Martínez-Gutián M, Lores M, Bou G, Pérez A. Anti-adhesive activity of a *Vaccinium corymbosum* polyphenolic extract targeting intestinal colonization by *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2020, 132: 110885
- [22] Kadivec M, Bornšek ŠM, Polak T, Demšar L, Hribar J, Požrl T. Phenolic content of strawberry spreads during processing and storage[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(38): 9220-9229
- [23] Hosseinian FS, Li WD, Beta T. Measurement of anthocyanins and other phytochemicals in purple wheat[J]. *Food Chemistry*, 2008, 109(4): 916-924
- [24] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. M100-S30, CLSI, 2020
- [25] Ashrafudoulla M, Mizan MFR, Ha AJW, Park SH, Ha SD. Antibacterial and antibiofilm mechanism of eugenol against antibiotic resistance *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Food Microbiology*, 2020, 91: 103500
- [26] Zhang LL, Zhang LF, Xu JG. Chemical composition, antibacterial activity and action mechanism of different

- extracts from hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bge.)[J]. Scientific Reports, 2020, 10: 8876
- [27] Lu X, Yang XY, Li X, Lu Y, Ren ZT, Zhao LY, Hu XX, Jiang JD, You XF. *In vitro* activity of sodium new houttuynon alone and in combination with oxacillin or netilmicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e68053
- [28] Qian W, Zhang J, Wang W, Wang T, Liu M, Yang M, Sun Z, Li X, Li Y. Antimicrobial and antibiofilm activities of paeoniflorin against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2020, 128(2): 401-413
- [29] Wang HL, Guo XB, Hu XD, Li T, Fu X, Liu RH. Comparison of phytochemical profiles, antioxidant and cellular antioxidant activities of different varieties of blueberry (*Vaccinium* spp.)[J]. Food Chemistry, 2017, 217: 773-781
- [30] 田恒, 张敏, 李正杰. 酶辅助提取金寨蓝莓花青素研究[J]. 园艺与种苗, 2018, 38(10): 9-11, 48  
Tian H, Zhang M, Li ZJ. Study on enzyme-assisted extraction of blueberry anthocyanin from Jinzhai[J]. Horticulture & Seed, 2018, 38(10): 9-11, 48 (in Chinese)
- [31] 杨天龙, 郑振兴, 张传洋, 王迪, 杨欢, 邓放. 青刺尖的体外抑菌作用初步研究[J]. 中药与临床, 2020, 11(4): 21-23  
Yang TL, Zheng ZX, Zhang CY, Wang D, Yang H, Deng F. Preliminary *in vitro* study on bacteriostatic effect of Qingcijiian[J]. Pharmacy and Clinics of Chinese Materia Medica, 2020, 11(4): 21-23 (in Chinese)
- [32] 程招敏, 陈泳余, 彭方, 蓝锴, 周强, 柯培锋. 多种中药对泛耐药肺炎克雷伯菌体外抗菌活性筛选[J]. 蚌埠医学院学报, 2020, 45(4): 515-518, 522  
Cheng ZM, Chen YY, Peng F, Lan K, Zhou Q, Ke PF. Screening of the traditional Chinese medicine with antibacterial activity against pan-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* *in vitro*[J]. Journal of Bengbu Medical College, 2020, 45(4): 515-518, 522 (in Chinese)
- [33] Cerezo AB, Cătunescu GM, González MMP, Hornedo-Ortega R, Pop CR, Rusu CC, Chirilă F, Rotar AM, Garcia-Parrilla MC, Troncoso AM. Anthocyanins in blueberries grown in hot climate exert strong antioxidant activity and may be effective against urinary tract bacteria[J]. Antioxidants, 2020, 9(6): 478
- [34] Qian WD, Wang WJ, Zhang JN, Wang T, Liu M, Yang M, Sun ZH, Li X, Li YD. Antimicrobial and antibiofilm activities of ursolic acid against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. The Journal of Antibiotics, 2020, 73(6): 382-391
- [35] Dhara L, Tripathi A. Cinnamaldehyde: a compound with antimicrobial and synergistic activity against ESBL-producing quinolone-resistant pathogenic *Enterobacteriaceae*[J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2020, 39(1): 65-73
- [36] Dang YL, Hao L, Li X, Sun YY, Pan DD, Wu Z, Shen JM. Inhibitory mechanism of Chinese herbal medicine extracts on *Escherichia coli* and its application to fermented-bag sausage[J]. LWT, 2021, 140: 110825
- [37] 杨秋玲, 王翔, 王志宏, 黄韬, 彭密军, 宁礼信. 外界因素和杜仲叶提取物对双乙酸钠的抑菌活性影响[J]. 食品工业科技, 2021, 42(2): 105-111, 118  
Yang QL, Wang X, Wang ZH, Huang T, Peng MJ, Ning LX. Effects of external factors and *Eucommia ulmoides* leaves extracts on antibacterial activity of SDA[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(2): 105-111, 118 (in Chinese)
- [38] Glass KA, Johnson EA. Antagonistic effect of fat on the antibotulinal activity of food preservatives and fatty acids[J]. Food Microbiology, 2004, 21(6): 675-682
- [39] Devlieghere F, Vermeulen A, Debevere J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables[J]. Food Microbiology, 2004, 21(6): 703-714
- [40] Bhatti M, Veeramachaneni A, Shelef LA. Factors affecting the antilisterial effects of nisin in milk[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 97(2): 215-219